

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

BIOREMEDIJACIJA PESTICIDA
BIOREMEDIATION OF PESTICIDES

SEMINARSKI RAD

Ana Ramljak

Preddiplomski studij Znanosti o okolišu

(Undergraduate Study of Environmental Sciences)

Mentor: doc. dr. sc. Tomislav Ivanković

Zagreb, 2018.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. PESTICIDI	1
2.1. POVIJEST UPOTREBE PESTICIDA	2
2.2. OSNOVNE ZNAČAJKE	3
3. UTJECAJ PESTICIDA NA OKOLIŠ I ČOVJEKA	5
4. BIOREMEDIJACIJA	7
4.1. BIOREMEDIJACIJA HERBICIDA	11
4.1.1. DIURON	11
4.1.2. GLIFOSAT	13
4.2. BIOREMEDIJACIJA INSEKTICIDA	15
4.2.1. NEONIKOTINOIDI	15
IMIDAKLOPRID	16
ACETAMIPRID	16
5. ZAKLJUČCI	19
6. LITERATURA	20
7. SAŽETAK	23
8. SUMMARY	23

1. UVOD

Znatan napredak poljoprivrede omogućila je proizvodnja i upotreba pesticida, no neizbježne posljedice njihove upotrebe su onečišćenje zraka, vode i tla te negativan utjecaj na zdravlje ljudi i životinja. Porastom upotrebe pesticida, tijekom 20. stoljeća, te uviđanjem njihove štetnosti, došlo je do potrebe za razvoj metoda njihovog uklanjanja iz prirode. Bioremedijacija je široko prihvaćena metoda koja djeluje na biološkoj osnovi. Djelovanjem bakterija, algi te biljaka i gljiva, procesom bioremedijacije, moguće je ukloniti toksikante iz okoliša te vratiti ga u prvotno stanje, bez stvaranja međuprodukata. U ovom radu iznijet će se osnovne značajke pesticida, povijest njihove upotrebe te posljedice na okoliš i čovjeka. Uz to, prikazat će se istraživanja bioremedijacije određenih herbicida i insekticida.

2. PESTICIDI

Prema definiciji Organizacije za prehranu i poljoprivredu Ujedinjenih naroda (eng. Food and Agriculture Organization (FAO)), pesticidi su tvar ili smjesa više tvari koje se upotrebljavaju u svrhu prevencije najezde, uništavanja ili suzbijanja bilo koje vrste štetočina (vektori u prijenosu bolesti ljudi i životinja, nepoželjne vrste biljaka i životinja koje stvaraju gubitke u procesu proizvodnje, obrade, uskladištenja, prijevoza ili stavljanja hrane na tržište, poljoprivrednih proizvoda, drveta, drvnih prerađevina te hrane za životinje) te suzbijanja štetočina koje parazitiraju u tijelu životinja ili na njihovom tijelu (Želježić i Perković 2011). Oko 85% proizvedenih pesticida primjenjuje se u poljoprivredi (Kim i dr. 2016). Također, procijenjeno je da se, uz upotrebu pesticida, proizvede skoro jedna trećina poljoprivrednih proizvoda (Zhang 2018). Ukupna svjetska potrošnja pesticida 2001. godine je, prema službenim podacima FAO-a, bila preko 1 100 000 tona aktivne tvari, od čega 46% herbicidi, a 26% insekticidi. U Europskoj uniji, prema podacima za 25 članica, 2001. godine potrošeno je preko 320 000 tona aktivne tvari, dok je u SAD-u i Kanadi iste godine potrošeno 390 000 tona aktivne tvari (Želježić i Perković 2011). 2015. godine, ukupna svjetska potrošnja pesticida bila je preko 2 700 000 tona aktivne tvari, dok je u Europskoj uniji, prema podacima za 24 članice, ukupna potrošnja bila preko 350 000 tona aktivne tvari (<http://www.fao.org>). Potrebno je naglasiti da za neke države i godine nisu dostupni podaci u bazi podataka FAO-a.

Zhang (2018) ističe dva razdoblja s obzirom na podatke o svjetskoj potrošnji

pesticida. Prvo razdoblje, od 1990. do 2007. godine, kada je utvrđen porast potrošnje pesticida te drugo razdoblje, od 2007. do danas, kada svjetska potrošnja pesticida opada.

Podaci o potrošnji pesticida u Hrvatskoj iz ranih 2000-ih su teže dostupni, no prema podacima FAO-a, 2004. godine ukupna potrošnja pesticida bila je 2174 tona aktivne tvari. Nadalje, 2010. godine ukupna potrošnja bila je 1540 tona aktivne tvari, a 2015. godine 2305.1 tona aktivne tvari (<http://www.fao.org>).

Prema podacima kineske vlade, 2016. godine Kina je po upotrebi pesticida dosegla 3 puta veću brojku od tadašnjeg svjetskog prosjeka, no 2017. godine donešena je odluka o zabrani svih visokotoksičnih pesticida do 2022. godine. Smatra se kako će se upotreba pesticida u Kini do 2020. smanjiti za oko 40% što je pozitivan primjer povećanja svijesti o štetnim učincima pesticida i o težnji za većom proizvodnjom i upotrebom novih ekološki prihvatljivijih i manje štetnih alternativa (Zhang 2018).

2.1. POVIJEST UPOTREBE PESTICIDA

Iako je prekomjerna upotreba pesticida danas globalni problem, činjenica je da ljudska civilizacija primjenjuje pesticide u poljoprivredi već tisućljećima. Zbog čestih gubitaka u poljima, a time i pojave masovne gladi, uzrokovanih raznim štetnicima i bolestima, bilo je nužno pronaći način kako kontrolirati štetnike i spriječiti takve događaje u budućnosti.

Razdoblje od 1845. do 1847. godine, obilježeno je pojavom gladi uzrokovanom bolešću biljaka poznatom kao krumpirova plijesan, koja je uništila polja krumpira u Irskoj zbog čega je umrlo oko milijun ljudi, a više od milijun ljudi migriralo je u Sjevernu Ameriku (<http://edis.ifas.ufl.edu>). Poznato je kako su Sumerani, prije otprilike 4 500 godina, koristili sumporne spojeve za zaštitu od kukaca i grinja. U Kini su se pak, prije oko 3 200 godina, koristili živini i arsenovi spojevi za kontrolu ušiju. Grci i Rimljani su koristili dim, paleći razne životinjske ostatke i vjerujući kako će taj neugodan miris ukloniti plijesni i uši. Insekticid piretrin, u upotrebi je preko 2 000 godina, a priprema se iz sušenog cvijeća biljke *Chrysanthemum cinerariaefolium* Trev., dalmatinski buhač (<https://agrochemicals.iupac.org>). Poznati fungicid koji se koristi od 1850-ih godina je tzv. bordoška juha (eng. Bordeaux mixture ili Bordo mix), mješavina modre galice i vapna za sprječavanje raznih bolesti, između ostalog i peronosporne vinove loze čijim otkrićem, smatra se, započinje suvremena primjena pesticida (<http://edis.ifas.ufl.edu>).

1940-ih godina počinje nagli porast proizvodnje i upotrebe sintetičkih pesticida zahvaljujući njihovoj niskoj cijeni te visokoj učinkovitosti. Jedan od najpoznatijih pesticida je

DDT (diklor-difenil-trikloretan) koji je, u to doba, bio u širokoj upotrebi. DDT je reklamiran kao niskotoksičan za sisavce te kao učinkovito sredstvo protiv bolesti uzrokovanih pojedinim vrstama kukaca, malarije, žute groznice i tifusa. Nakon nekoliko godina upotrebe DDT-a, otkriveni su slučajevi rezistencije pojedinih vrsta kukaca, ali i štetno djelovanje na ne ciljane biljke i životinje. U to vrijeme, nije se spominjalo štetno djelovanje DDT-a na zdravlje ljudi pa je i dalje korišten u sve većim količinama. Preokret, u tom pogledu, izazvala je knjiga Rachel Carson "Silent Spring" iz 1962. godine, u kojoj iznosi svoju zabrinutost zbog prekomjerne upotrebe pesticida i mogućih posljedica na živa bića i okoliš (<https://agrochemicals.iupac.org>). Posebice izdvaja činjenicu o ostacima pesticida i njihovoj aktivnosti te nakupljanju tih ostataka u tkivima životinja i prenošenju kroz hranidbeni lanac. DDT je zabranjen u SAD-u 1972. godine (<http://edis.ifas.ufl.edu>). Idućih desetljeća, počinje proizvodnja ekološki prihvatljivijih i selektivnijih pesticida, a svjesnost o štetnosti pesticida postaje sve izrazitija. Danas, sve veću ulogu na ovom području ima genetičko inženjerstvo pomoću kojeg se stvaraju genetički modificirane biljke otporne na štetnike (<https://agrochemicals.iupac.org>).

2.2. OSNOVNE ZNAČAJKE

Svi pesticidi sastoje se od barem jedne aktivne tvari i inertnih tvari. Prema Agenciji za zaštitu okoliša SAD-a (United States Environmental Protection Agency ili EPA), aktivna tvar uništava, sprječava ili odbija štetnika, može biti regulator biljke, stabilizator dušika i dr., a čini manji udio u ukupnom kemijskom sastavu. Postoje tri skupine aktivnih tvari, konvencionalne, antimikrobne te biopesticidi. Antimikrobne aktivne tvari sprječavaju rast štetnih mikroorganizama, bilo bakterija, virusa ili gljiva. Biopesticidi predstavljaju manje toksičnu alternativu tradicionalnim pesticidima budući da potječu iz prirodnih materijala (<https://www.epa.gov>). Zabilježen je sve veći porast upotrebe biopesticida zadnjih nekoliko godina te se smatra kako će u budućnosti njihova primjena dominirati (Zhang 2018). Inertne tvari su sve druge tvari u pesticidu koje poboljšavaju učinkovitost samog pesticida (<https://www.epa.gov>). Pojam "inertno" ne označava nužno netoksične tvari te ponekad inertne tvari mogu biti toksičnije od aktivnih (<http://www.ccohs.ca>). Zakonom je određeno kako na proizvodu mora biti naveden točan naziv aktivne tvari te njen maseni udio. S druge strane, proizvođači pesticida nisu dužni navesti nazive inertnih tvari niti njihov maseni udio, već samo ukupni postotak inertnih tvari u pesticidu. Prije upotrebe pesticida u proizvodnji, inertne tvari prolaze postupak provjere toksičnosti, a njihova uloga je raznovrsna. Primjerice, djeluju kao otapala i tako omogućuju prodiranje aktivne tvari pesticida u list biljke, produljuju rok trajanja

pesticida, ili pak onemogućuju degradaciju pesticida prilikom izlaganja Sunčevoj svjetlosti (<https://www.epa.gov>).

Pesticidi se najčešće dijele s obzirom na ciljanu skupinu štetnika na: insekticide (kukci), herbicide (korovi i druge štetne biljke), rodenticide (glodavci), fungicide (gljive), akaricide i miticide (krpelji i grinje), moluskicide (mekušci), avicide (ptice), algicide (alge), baktericide (bakterije), virucide (virusi). Uz to, postoji i podjela pesticida s obzirom na način njihovog djelovanja, koja uključuje kontaktne (nesistemske) i sistemske pesticide. Kontaktne pesticidi ne prodiru u biljno tkivo i ne prenose se kroz vaskularni sustav biljke, a željeni učinak se postiže samo u slučaju izravnog kontakta sa štetnikom. S druge strane, nesistemiški pesticidi prodiru u biljno tkivo i prenose se vaskularnim sustavom te se na taj način postiže željeni učinak kontrole ciljanog štetnika. Podjela pesticida temeljena na kemijskom sastavu uključuje četiri osnovne skupine: organoklorini, organofosforni, karbamati, piretrin i piretroidi (Zacharia 2011). Ovisno o mjestu primjene pesticida, dijele se u dvije skupine: sredstva za zaštitu bilja i biocidi. Biocidi se općenito koriste za osobnu higijenu, za zaštitu materijala i u javnom zdravstvu (Željezić i Perković 2011). Za pomnije razumijevanje načina djelovanja pesticida, bitno je istaknuti podjelu pesticida na selektivne i neselektivne. Selektivni su oni koji ubijaju samo određenu skupinu ili vrstu štetnika, dok na druge organizme imaju mali ili nikakav utjecaj. Neselektivni pesticidi pak uništavaju široki spektar štetnika te imaju štetan utjecaj na druge organizme, primjerice ribe, gmazove, ptice i kućne ljubimce (Zacharia 2011).

Budući da će se u ovom radu istaknuti bioremedijacija pojedinih herbicida i insekticida, potrebno je navesti način djelovanja tih dvaju skupina pesticida. Kontrola štetnih korova i drugih biljaka se zasniva na nekoliko različitih procesa uzrokovanih primjenom herbicida: oštećenje stanica unutar listova i njihovo sušenje, poremećaj rasta i razvoja, poremećaj procesa fotosinteze, promjena unosa nutrijenata i dr. Selektivnost herbicida označava uspješnost utjecaja herbicida na ciljanog štetnika bez štetnog utjecaja na okolne biljke, a ovisi o starosti biljke, stadiju razvoja, morfologiji biljke, apsorpciji, translokaciji između korova i biljke, deaktivaciji herbicida od strane biljke i okolišnim uvjetima (<http://pest.ca.uky.edu>). S druge strane, brojni insekticidi djeluju na određena mjesta u živčanom sustavu kukca, uzrokuju dehidraciju i gladovanje što dovodi do smrti. Kontakt s insekticidom može biti direktan kapljicama insekticida preko kutikule štetnika, oralnim putem ili respiratornim putem (<http://www.health.gov.au>). Bakterijski toksini koje proizvode mikroorganizmi u tlu uzrokuju poremećaj probavnog trakta gusjenica, biljni insekticidi djeluju na razne načine na živčani sustav, dok regulatori rasta, temeljeni na hormonima regulatorima razvoja člankonožaca, remete metamorfozu mladih nezrelih jedinki i aktivno djeluju samo na

njih (<http://pest.ca.uky.edu>).

Učinkovitost pesticida u kontroli ciljanog štetnika uvelike ovisi o fizikalnim i kemijskim svojstvima koja znatno variraju ovisno o pesticidu. Fizikalna svojstva uvjetuju način djelovanja pesticida, doziranje, način primjene te kemodinamičke procese u okolišu. Neka od bitnijih fizikalnih svojstava su relativna molekulska masa i fizikalna forma aktivne tvari, tlak para, topljivost. Pesticidi s fumigantnim načinom djelovanja (djelovanje parama na dišni sustav štetnika) i visokim tlakom para mogu uzrokovati onečišćenje atmosfere, dok pesticidi s niskim tlakom para ne odlaze u atmosferu, ali se mogu akumulirati u vodi (pesticidi topljivi u vodi) ili u tlu i organizmima (pesticidi netopljivi u vodi). Topljivost je izrazito bitno svojstvo zbog toga što se pesticidi dobro topljivi u vodi neće zadržavati u tlu i organizmima te će procesom hidrolize biti razgrađeni (Zacharia 2011).

Kemodinamički procesi koji se zbivaju nakon što pesticidi dođu u okoliš ponajviše ovise o fizikalno-kemijskim svojstvima samog pesticida, ali su određeni i nekim okolišnim uvjetima kao što su pH vrijednost, temperatura, vlažnost, salinitet, intenzitet svjetlosti i dr. Kemodinamički procesi koji uvjetuju sudbinu pesticida u okolišu uključuju transport, retenciju, degradaciju i unos od strane organizama. Posebice je potrebno istaknuti degradaciju kojom dolazi do transformacije pesticida u druge forme koje nisu nužno jednostavnije i manje toksične. Primjerice transformacija insekticida DDT-a (diklor-difenil-trikloretna) u DDD (diklor-difenil-dikloretna) koji isto kao i DDT djeluje kao pesticid. Proces degradacije obuhvaća kemijsku i biološku degradaciju. Kemijska se odvija u vodi ili u atmosferi te uključuje oksidaciju, redukciju, hidrolizu i fotolizu, dok biološka uključuje procese oksidacije, redukcije, hidrolize i konjugacije, a odvija se u tlu ili u organizmima (Zacharia 2011).

3. UTJECAJ PESTICIDA NA OKOLIŠ I ČOVJEKA

Većina sintetičkih pesticida se dugotrajno zadržava u okolišu nakon upotrebe te su njihovi ostaci zabilježeni u tlima i u vodenim i morskim ekosustavima. Zadržavanjem u okolišu komponente pesticida ulaze u hranidbeni lanac i na taj način dospijevaju do ljudi. Općenito, kemijske komponente pesticida prolaze razne kemijske transformacije te se tako šire i izvan područja primjene, u druge ekosustave, gdje ubijaju neciljane organizme. Uz to, bitno je naglasiti mogućnost širenja toksičnih isparavanja pesticida u atmosferi. Primjerice, zabilježeno je isparavanje herbicida iz skupine organofosfata, tijekom njegove primjene u tropskom području Središnje Amerike, pri čemu je došlo do širenja tih para sve do Arktika. Isto tako,

ostaci pesticida, posebice herbicida, predstavljaju veliku prijetnju koraljnim grebenima što su potvrdila istraživanja na Velikom koraljnom grebenu u Australiji. Nadalje, potrebno je istaknuti i izrazito onečišćenje pitkih voda i podzemnih vodonosnika. S druge strane, moguć je i nestanak određenih akvatičkih vrsta, budući da je dokazana bioakumulacija toksičnih tvari i u vrlo malim količinama, što iznimno utječe na ličinačke stadije pojedinih organizama. Svi navedeni razlozi dovode do smanjenja bioraznolikosti i funkcionalnosti čitavih ekosustava (Carvalho 2017). Vodeni ekosustavi su pod direktnim ili indirektnim utjecajem pesticida zbog raspršivanja ili otjecanja pesticida čime su ugrožene mnoge vodene vrste biljaka, mikro i makroinvertebrata i vertebrata. Zabilježeno je veliko povećanje mortaliteta nekih vrsta riba, a ugrožen je i opstanak i razvoj nekih vodozemaca. Što se tiče tla, najviše istraživanja se odnosi na utjecaj pesticida na mikroorganizme, ponajviše bakterije koje imaju veliku ulogu u degradaciji pesticida u okolišu pa pesticidi za njih mogu biti korisni, ali i štetni u smislu ograničavanja njihovog rasta i razvoja. Prisutnost pesticida u tlu ugrožava i gujavice te su uzrok smanjenja njihovih populacija, ali i oštećenja njihovih DNA. Ugroženi su i brojni člankonošci u tlu i u vodi, kao i mnogi drugi beskralješnjaci čije je stanište tlo, a važni su za normalno funkcioniranje čitavih ekosustava. (Dahab i dr. 2017).

Opće je poznato kako je izlaganje pesticidima štetno za ljudsko zdravlje te se može reći kako danas ne postoji čovjek koji nije na neki način izložen takvom utjecaju. Ljudi se najčešće izlažu pesticidima tijekom kućne ili profesionalne upotrebe, preko hrane ili pića koji sadrže ostatke pesticida i udisanjem pesticida zagađenog zraka (Kim i dr. 2016). Oko 25 milijuna poljoprivrednika godišnje se slučajno otruje pesticidima (Carvalho 2017). Postoje četiri osnovna načina ulaska pesticida u ljudski organizam: dermalnim, oralnim, očnim i respiratornim putem. Neke od bolesti čiji je dokazani uzročnik izlaganje pesticidima su astma, rak, dijabetes, leukemija, Parkinsonova bolest (Kim i dr. 2016). Uz to, zabilježeni su i endokrini poremećaji, abnormalnosti pri rođenju te neplodnost, a kratkotrajni poremećaji su obično glavobolje i mučnine (Dahab i dr. 2017). Nadalje, zabrinjavajuća je činjenica da su zabilježene određene koncentracije pesticida u adipoznom tkivu kako životinja, tako i ljudi te se preko majčinog mlijeka te tvari prenose na novorođenčad (Carvalho 2017).

Stockholmska konvencija, iz 2001. godine, međunarodni je ugovor koji sadrži odredbe o smanjenju ili sprječavanju ispuštanja 12 postojećih organskih onečišćujućih tvari (POO) u okoliš te je Republika Hrvatska jedna od potpisnica Konvencije. Postojane organske onečišćujuće tvari definirane su kao tvari koje se odupiru fotolitičkoj, biološkoj i kemijskoj degradaciji te su toksične, postojane, nakupljaju se u živim organizmima, sklone su prijenosu na velike udaljenosti i štetne za okoliš i ljudsko zdravlje. Tri su skupine takvih tvari: pesticidi,

industrijske kemikalije i međuprodukti. Pesticidi navedeni u konvenciji su: DDT, aldrin, dieldrin, klordan, endrin, heptaklor, heksaklorbenzen, mirex, toksafen (<http://www.mzoip.hr>). Prema nekim novijim istraživanjima pokazano je kako se uistinu u zadnjih nekoliko godina nakon provođenja mjera iz Konvencije smanjuje koncentracija DDT-a u adipoznom tkivu ljudi i majčinom mlijeku (Carvalho 2017).

Pretjeranom upotrebom pesticida ugroženi su i brojni neciljani organizmi, a među njima se ističu predatori štetnika koji kontroliraju njihove populacije i čijim gubitkom može doći do masovnog porasta tih populacija te polinatori o kojima ovisi većina poljoprivrednih površina. Prema mnogim istraživanjima u kojima su proučavani razlozi nestanka predatorskih populacija, uočeno je kako su upravo pesticidi najveći uzrok tome. Pesticidi utječu na ponašanje predatora, stopu rasta, vrijeme razvoja i druge reproduktivne funkcije. Primjerice, istraživanjima u istočnom dijelu SAD-a uočena je promjena ponašanja nekih vrsta paukova i kornjaša zbog utjecaja herbicida temeljenih na aktivnoj tvari glifosatu. Što se tiče polinatora, zabilježen je pad brojnosti vrsta polinatora u zadnjih nekoliko desetljeća, a smatra se kako bi to moglo utjecati na gubitak pojedinih biljnih vrsta, i obrnuto. 35% svih usjeva ovisi o polinatorima te su pčele zasigurno najpoznatije i ekonomski najvažnije u tom pogledu. Osim toga, medonosna pčela (*Apis mellifera*, L.), pridonosi i bioraznolikosti oprašujući divlje biljne vrste. Indirektno, pesticidi utječu na reproduktivnu uspješnost oprašivača, a zabilježeni su i neobični slučajevi uginuća pčela radilica te promjene ponašanja, posebice u slučaju korištenja neonikotinoida i piretroida. Osim pčela, ugroženi su i bumbari, leptiri, vretenca, bubamare, mrežokrilci i dr. koji dolaze u kontakt s ostacima pesticida u peludi ili nektaru te zagađenom tlu, vodi, zraku (Dahab i dr. 2017).

4. BIOREMEDIJACIJA

Značajan broj pesticida postojan je u okolišu te ostavlja brojne, već spomenute, negativne učinke na sami okoliš i živa bića, a zbog svojih fizikalno-kemijskih svojstava nije moguća njihova degradacija ili ne postoji dovoljan broj organizama u okolišu koji bi provodio uspješnu biodegradaciju. Spoznajom mogućnosti biodegradacije pomoću organizama, definiran je postupak bioremedijacije. Isprva, za bioremedijaciju su korišteni mikroorganizmi, bakterije i gljive, no moguća je upotreba i algi i biljaka. Bioremedijacija se općenito odnosi na postupak koji se provodi kako bi se uklonili negativni utjecaji onečišćujućih tvari iz okoliša, no

potrebno je imati na umu kako potpuno uklanjanje tih tvari nije uvijek moguće. Neki organizmi akumuliraju onečišćujuće tvari te tako smanjuju njihovu koncentraciju u okolišu, no ne uklanjaju ih u potpunosti (Velázquez-Fernández 2012). Proces bioremedijacije pospješuje mikrobnu biodegradaciju onečišćujućih tvari dodatkom hranjivih tvari, izvora ugljika ili elektron akceptora (Frazar 2000). Dakle, bioremedijacija koristi biološke procese i prirodnu mikrobnu kataboličku aktivnost za uklanjanje, redukciju ili transformaciju onečišćujućih tvari u manje štetne produkte poput CO₂, H₂O, anorganskih soli te mikrobne biomase (Elekwachi i dr. 2014). Na kraju procesa, u idealnom slučaju, onečišćujuće tvari su u potpunosti mineralizirane te nema međuprodukata (Frazar 2000). Proces mineralizacije uključuje biodegradaciju čiji su produkti spojevi kao CO₂ koji zatim mogu biti uključeni u proces biološke asimilacije (Velázquez-Fernández 2012). Iako je bioremedijacija široko prihvaćena, njenu praktičnu upotrebu još uvijek sputava nepotpuno razumijevanje genetike, obilježja korištenih organizama na genomskoj razini, metaboličkih puteva te kinetike. Zbog toga nije moguće modelirati ni predvidjeti rezultate samog procesa što utječe na uspješnost provedbe bioremedijacije na terenu (Elekwachi i dr. 2014). Uz to, mnogi znanstvenici su pokušavali dizajnirati genetički modificirane bakterije koje bi se koristile za bioremedijaciju onečišćenih područja, no ti organizmi se u prirodi ne ponašaju na predvidljiv način budući da su uvjeti u prirodi uvelike drukčiji od laboratorijskih uvjeta (Antizar-Ladislao 2010).

Pojmovi biodegradacija i biotransformacija spominju se u literaturi te su naizgled sinonimi, no postoje razlike koje je bitno istaknuti. Biodegradacija obuhvaća biološke reakcije kojima dolazi do promjene kemijske strukture neke tvari, a time i smanjenja njene toksičnosti, dok se biotransformacijom smanjuju koncentracije neke tvari modifikacijama ili translokacijama te se biotransformacijom mogu povećati ili smanjiti neželjeni efekti (Velázquez-Fernández 2012).

Proces bioremedijacije poznat je još od 1940-ih godina, a prva upotreba mikroorganizama za uklanjanje naftnog izljeva bila je 1960-ih godina u kanjonu Cat, u SAD-u, gdje je nafta dospjela u sustav odvodnje, obližnje vodotoke te sustav vodoopskrbe. Jedan od prvih znanstvenih radova s temom primjene bioremedijacije objavljen je 1987. godine u kojem je opisan postupak uklanjanja 20 milijuna litara organskog kemijskog otpada, ponajviše industrijskog podrijetla, u laguni blizu Houstona, u SAD-u. Među najpoznatijim katastrofama je izlijevanje nafte iz tankera Exxon Valdez u Aljasci, 1989. godine što je uzrokovalo ugiibanje velikog broja životinjskih vrsta tog područja, a za uklanjanje nafte pomoću bioremedijacije izdvojeno je više od 2 milijarde dolara (Antizar-Ladislao 2010). Izlijevanje nafte koje se dogodilo 2010. godine u Meksičkom zaljevu na naftnoj platformi, zabilježeno je kao najveće

izlijevanje nafte u moru ikada te su ovom katastrofom znatno ugrožena staništa morskih životinja, kao i ribarstvo i turizam na tom području, a jedna od metoda uklanjanja onečišćenja bila je bioremedijacija (<https://en.wikipedia.org>).

Bioremedijacija se provodi *ex situ* ili *in situ* metodom. *Ex situ* bioremedijacija se odvija izvan mjesta onečišćenja, a *in situ* se odvija na mjestu samog onečišćenja (Iwamoto i Nasu 2001). *Ex situ* bioremedijacija uključuje biofiltre, bioreaktore, kompostiranje i *land spreading* (Đokić i dr. 2012). U bioreaktorima se obrađuje onečišćeni kruti materijal (tlo, sediment, mulj) ili voda kroz projektirani zatvoreni sustav (Sharma 2012). Različite varijante bioreaktora mogu se spajati kako bi rezultati bili bolji (Đokić i dr. 2012). Kompostiranje je aerobni proces, a obuhvaća miješanje onečišćenog tla i organskog supstrata koji služi kao izvor ugljika za mikoorganizme (Antizar-Ladislao 2010; Đokić i dr. 2012). Kompostiranje se odvija pri visokim temperaturama, najčešće u rasponu 55-65 °C, a povećanje temperature proizlazi iz topline proizvedene prilikom biodegradacije onečišćujućih tvari mikroorganizmima (Sharma 2012). *Land spreading* je jedna od najčešće korištenih metoda *ex situ* bioremedijacije u SAD-u zbog niske cijene, a obuhvaća miješanje onečišćenog medija s tlom pri čemu prirodno prisutni organizmi vrše biodegradaciju kontaminanata (Đokić i dr. 2012). *In situ* bioremedijacija uključuje bioventiliranje (eng. bioventing), bioprskanje (eng. bioparging) i biostimulaciju (Đokić i dr. 2012). Bioventiliranje i bioprskanje su slične metode kojima se potiče aktivnost prirodno prisutnih organizama na način da se zrak (kisik) upuhuje u nesaturiranu (vadoznu) zonu (bioventiliranje) ili u saturiranu zonu (bioprskanje) (Antizar-Ladislao 2010). Općenito, *in situ* metode su češće korištene jer zahtijevaju manje opreme, jeftinije su te ne uzrokuju velike promjene u okolišu (Frazar 2000). Bioatenuacija, biostimulacija i bioaugmentacija su tri osnovne kategorije koje obuhvaćaju *in situ* metode bioremedijacije. Bioatenuacija je prirodni proces degradacije koji je potrebno konstantno pratiti kako bi se osiguralo smanjenje koncentracije onečišćujuće tvari (Iwamoto i Nasu 2001). Zapravo uključuje sve biološke, kemijske i fizikalne procese kojima se neka onečišćujuća tvar transformira u bezopasnu formu ili imobilizira ispod površine (Antizar-Ladislao 2010). Imobilizacija je transformacija anorganskih komponenti u organske pomoću mikroorganizama ili biljaka čime te tvari postaju nedostupne biljkama (<https://en.wikipedia.org>). Biostimulacija je manipulacija okoliša kako bi se stimulirala biodegradacija u slučaju da se bioatenuacija ne događa ili je prespora. Uključuje opskrbljivanje okoliša nutrijentima (npr. dušik, fosfor), elektron akceptorima (npr. kisik) te supstratima (npr. metan, toluen, fenol). Budući da su neki od često korištenih supstrata toksični, njihove koncentracije se moraju kontinuirano pratiti tijekom provođenja biostimulacije. Bioaugmentacija je inokulacija selektiranih bakterija na onečišćena područja čime se

pospješuje biodegradacija toksikanata koje je nemoguće ukloniti bioatenuacijom ili biostimulacijom. Kod provođenja bioaugmentacije potrebno je unaprijed utvrditi moguće štetne utjecaje na okoliš i zdravlje ljudi te ugibanje inokuliranih bakterija nakon bioremedijacije kako ne bi bila ugrožena prirodna mikrobna zajednica tog područja (Iwamoto i Nasu 2001).

Općenito, bioremedijacija se temelji na pronalasku i izolaciji organizama koji su prilagođeni na okoliš onečišćen nekom tvari te izdvajanju mogućih bioremedijatora među tim organizmima. Svaki organizam koji ima sposobnost biodegradacije mora biti tolerantan na onečišćujuću tvar, no nije svaki organizam koji je tolerantan na onečišćujuću tvar ujedno i bioremedijator. Prilagodba organizama na toksikante u svojim staništima se objašnjava vršenjem evolucijskog pritiska, npr. pesticida, na organizme u okolišu gdje bi samo oni najprilagođeniji uspjeli preživjeti (Velázquez-Fernández 2012). Mikroorganizmi se mogu prilagoditi na vrlo ekstremne okoliše, no osnovni uvjeti za njihov rast i razvoj su izvor energije i izvor ugljika. Nadalje, za uspješnu bioremedijaciju korišteni organizmi moraju svojim enzimima djelovati na kontaminante i transformirati ih u bezopasne tvari te na taj način smanjiti njihovu koncentraciju na prihvatljive vrijednosti (Sharma 2012).

Čimbenici koji utječu na uspješnost bioremedijacije su: prisutnost mikrobne populacije (ili populacije nekih drugih organizama) sposobne za biodegradaciju onečišćujućih tvari, dostupnost onečišćujućih tvari tim organizmima te niz okolišnih uvjeta poput pH vrijednosti, temperature, prisutnosti kisika i ostalih elektron akceptora, nutrijenata, tipa tla (Sharma 2012). Bilo koji čimbenik može poremetiti rast i metabolizam organizma bioremedijatora i tako utjecati na bioremedijaciju. Uz to, bitni čimbenici su i stanje mikrobnog konzorcija te kometabolizam (potreba organizama za drugim supstratima tijekom biodegradacije) (Velázquez-Fernández 2012). Mikrobni konzorcij je definiran kao zajednica mikroorganizama u kojoj dolazi do izmjene nutrijenata, plina i metabolita između organizama čime se pospješuje rast i učinkovitost biogeokemijskih ciklusa, a nastaje zbog određene zaštite od stresnih promjena u okolišu (<http://www.unc.edu>). Većina neuspjeha tijekom provedbe bioremedijacije se događa zbog nedostatka nutrijenata, predatorstva ili parazitizma, kompeticije, imobilnosti korištenih organizama, previsokih koncentracija kontaminanta za preživljavanje organizama, hranjenja organizama drugim supstratima. Uz to, svako onečišćeno područje ima posebne okolišne uvjete i fizikalno-kemijska obilježja te rezultati nisu uvijek jednako učinkoviti kao tijekom laboratorijskog istraživanja gdje je moguće kontrolirati cijeli eksperiment i optimalne uvjete (Antizar-Ladislao 2010).

Bioremedijacija je prepoznata kao sigurna, jeftina, učinkovita i održiva tehnologija koja je danas široko prihvaćena. Usprkos tome, ne postoje podaci o primjeni bioremedijacije

na svjetskoj razini. Većina istraživanja, čiji je cilj bio prikupiti takve podatke, rađena je preko telefonskih intervjuja, e-mail pošte, intervjuja uživo ili internetskih pretraživača (Elekwachi i dr. 2014). U istraživanju Elekwachi i dr. (2014), e-mailom su kontaktirane različite organizacije povezane s bioremedijacijom. Stopa odgovora bila 7.8%, stoga je nepouzdanost primijeniti rezultate ovog istraživanja na cijeli svijet. Najviše odgovora primljeno je iz SAD-a i Europe. Jedno od postavljenih pitanja odnosilo se na preferiranu metodu uklanjanja onečišćenja iz okoliša te se 51% odgovora odnosilo na postupak bioremedijacije (mikrobna 35% i fitoremedijacija 16%). No, stvarni podaci iz prijašnjih istraživanja pokazuju suprotno te se glavnim uzrokom manje upotrebe u praksi smatraju poteškoće u dizajniranju samog postupka. To uključuje identifikaciju odgovarajućih organizama za uklanjanje onečišćenja, optimiziranje okolišnih uvjeta za djelovanje tih organizama, utvrđivanje opsega eventualnog čišćenja te nepotpuno razumijevanje mehanizama i procesa koji se pritom odvijaju. Prema podacima za Ujedinjeno Kraljevstvo, u razdoblju od 2000. do 2007. godine, od 391 onečišćenog područja *in situ* bioremedijacija je primijenjena na samo 4. U SAD-u, u razdoblju od 1982. do 2005. godine, provedeno je 60 *ex situ* i 53 *in situ* postupaka bioremedijacije što čini oko 12% ukupnog broja projekata (997) u tom razdoblju (Elekwachi i dr. 2014).

4.1. BIOREMEDIJACIJA HERBICIDA

4.1.1. DIURON

Diuron je jedan od najviše korištenih herbicida iz skupine fenil ureja herbicida, a uglavnom se primjenjuje za kontrolu vegetacije na poljoprivrednim ili nepoljoprivrednim površinama te u industrijskim i urbanim područjima. Zbog svoje široke primjene otkriven je u rijekama, jezerima, podzemnim vodama, morskoj vodi i sedimentu, kišnici iz urbanih i ruralnih područja. Osim diurona, u vodama su otkriveni njegovi osnovni metaboliti koji su štetniji za neciljane organizme od samog diurona (Ngigi i dr. 2011). Diuron se teško apsorbira u tlo i sediment, sporo se razgrađuje te je zbog toga postojan duže vrijeme u tlu i u vodi (Moncada 2004). Vrijeme poluraspada diurona iznosi 330 dana (Wang i dr. 2017). Uz to, diuron je mobilan pa dolazi do kretanja izvan mjesta primjene, površinskim otjecanjem ili migracijom u podzemne vode. Kada dospije do biljke, djeluje tako da otežava proces fotosinteze te onemogućuje stvaranje ATP-a (adenozin trifosfata) i ostalih energetski bitnih spojeva potrebnih za rast biljke. Diuron je umjereno toksičan za ribe i vodene beskrležnjake, a nije primijećeno njegovo znatno zadržavanje u tkivima sisavaca (Moncada 2004). Ipak, nedavna istraživanja su

počela ispitivati mogućnost karcinogenosti diurona za ljude (Wang i dr. 2017).

Prema Ngigi i dr. (2011), diuron se u Keniji značajno primjenjuje u poljima šećerne trske te su njegovi ostaci i metaboliti pronađeni u okolnim rijekama i jezeru Viktorija. Biodegradacija je testirana u uzorcima tla s 4 različita polja šećerne trske, s različitim početnim koncentracijama diurona i njegovih metabolita. Od 15 izoliranih sojeva, najučinkovitiju biodegradaciju pokazali su *Bacillus cereus*, *Bacillus spp1*, *Vagococcus fluvialis* te *Burkholderia ambifaria*. Prema rezultatima, nije bilo većih varijacija u degradaciji te je najveća biodegradacija bila uz upotrebu *V. fluvialis*, 25% početne koncentracije diurona (40 mg L^{-1}). Povećana biodegradacija zabilježena je pri upotrebi kombinacije bakterija *V. fluvialis* i *B. ambifaria* koji su degradirali 30.2% početne koncentracije diurona, uz stvaranje dva različita metabolita. (Ngigi i dr. 2011)

Još jedno istraživanje temeljeno je na uzorcima s polja šećerne trske, no u tom istraživanju je korištena endofitska gljiva *Neurospora intermedia*. Endofiti su endosimbionti koji žive u tkivu biljke bez štetnog utjecaja na samu biljku, a ključni su za prilagodbu biljke na onečišćeni okoliš. Soj gljive je izoliran s korijena šećerne trske iz polja u Kini na kojem je primjenjivan diuron te je gljiva identificirana morfološkim analizama i sekvenciranjem. Pri optimalnim uvjetima, rezultati pokazuju kako se u prvom danu koncentracija diurona izrazito smanjila te je unutar 3 dana uklonjeno 98% diurona, uz stvaranje dva metabolita (DCPU (*N*-(3,4-diklorofenil)urea) i DCPMU (*N*-(3,4-diklorofenil)-*N*-metilurea)). Tijekom procesa biodegradacije diurona, biomasa gljive se iznimno povećala što ukazuje na mogućnost iskorištavanja diurona za rast. Pokazalo se kako je biodegradacija učinkovita pri početnoj koncentraciji nižoj od 100 mg L^{-1} , a najučinkovitije uklanjanje diurona zabilježeno je u uzorku s dodanim topivim škrobom (99.75%). Bitno je naglasiti kako isti soj gljive pokazuje sposobnost biodegradacije i drugih fenil ureja herbicida (Wang i dr. 2017).

Safi i dr. (2014) su proveli istraživanje biodegradacije diurona pomoću cijanobakterijskih pokrova na uzorcima tla s poljoprivrednih površina gdje nije primjenjivan diuron. Cijanobakterijski pokrovi su dodani vlažnim uzorcima tla koji su prskani određenim koncentracijama diurona. Nadalje, u uzorke tla su posijali sjeme biljke čiji je rast ukazivao na degradaciju herbicida. Rezultati su pokazali kako se biodegradacija događa pri niskim koncentracijama diurona, no pri visokim koncentracijama degradacije nema. Moguće objašnjenje za to je toksičnost visokih koncentracija diurona za cijanobakterije ili slična toksičnost metabolita koji su produkti degradacije. Test-biljka nakon prvog dana inkubacija nije znatno rasla što ukazuje na aktivnost diurona u tlu. Nakon 15. dana inkubacije biljka znatnije raste što ukazuje na degradaciju diurona. Iako istraživanje nije nastavljeno nakon 15. dana,

uočava se spori napredak biodegradacije, a s time i daljnje smanjenje koncentracije diurona (Safi i dr. 2014).

4.1.2. GLIFOSAT

Glifosat pripada skupini organofosfornih herbicida te u molekuli ima stabilnu ugljik-fosfor (C-P) vezu zbog čega njegovo uklanjanje iz okoliša pomoću kemijskih metoda degradacije nije učinkovito (Moneke i dr. 2010). Ima visoku sposobnost akumulacije u tlu i štetan je za okoliš i ljudsko zdravlje. Prema nekim istraživanjima, izlaganje glifosatu uzrokuje oštećenje stanica jetre, genske mutacije, strukturalne promjene kromosoma i dr. Uz to, sprječava rast mikroorganizama u tlu, a toksičan je i za pojedine vodene organizme. Glifosat je zabilježen ispod površine, u podzemnim vodama i dublje u tlu što ukazuje na njegovu vertikalnu mobilnost uzrokovanu atmosferskom precipitacijom i zalijevanjem (Ermakova i dr. 2010). Kada dospije u biljku, djeluje na način da sprječava sintezu esencijalnih aminokiselina potrebnih za rast biljke (Moneke i dr. 2010). Glifosat je najčešće korišteni pesticid u svijetu. U SAD-u, 2014. godine, korišteno je oko 1 kg/ha na poljopivrednim površinama. Iako postoje odredbe za maksimalnu dnevnu upotrebu od 1.75 mg/kg tjelesne mase u SAD-u te 0.5 mg/kg tjelesne mase u EU, proučavajući toksičnost glifosata, postoji potreba za snižavanjem te vrijednosti na 0.1 mg/kg tjelesne mase dnevno (Carvalho 2017).

Istraživanje bioremedijacije tla kontaminiranog s glifosatom provedeno je u laboratoriju i na zemljištu (*in situ*). Tlo korišteno za *in situ* bioremedijaciju nije bilo onečišćeno, što je potvrđeno toksikološkim testovima s test-organizmima (*Daphnia* sp. i gujavice) i test-biljkama. Bakterijski sojevi koji su pokazali najveću sposobnost biodegradacije glifosata su izolirani iz tla kontaminiranog s glifosatom te su identificirani pomoću 16S rRNA analize kao *Achromobacter* sp. i *Ochrobactrum anthropi*. Ti sojevi su nadalje korišteni u istraživanju i pokazali su netoksičnost za test-organizam, *Daphnia magna*, i test-biljku, zob. Također, spomenuti bakterijski sojevi nisu pokazali toksičnost ni za testirane sisavce, bijele miševе i štakore. Na uzorke tla i na zemljišta, poprskana je otopina glifosata te je, nakon 72 sata, ravnomjerno dodana suspenzija mikroorganizama. U laboratorijskom istraživanju, uzorci tla su analizirani na početku i na kraju eksperimenta. U *in situ* istraživanju, uzorci tla su uzimani svaki tjedan kroz 28 dana s površine zemljišta, do 20 cm ispod površine. U laboratorijskom eksperimentu, rezultati su pokazali kako je *Achromobacter* sp. uspješno uklonio 65.8%, a *O. anthropi* 49.5% glifosata nakon 21 dana inkubacije. U *in situ* eksperimentu stopa biodegradacije bila je najveća u prvom tjednu kada se količina glifosata smanjila za 56.3% (*Achromobacter*

sp.) i 35% (*O. anthropi*). Na kraju eksperimenta, nakon 28 dana, količina glifosata je smanjena za 75.2% (*Achromobacter* sp.) i 61.5% (*O. anthropi*). U oba eksperimenta, uvođenjem bakterijskih sojeva, zabilježena je smanjena toksičnost tla što je potvrđeno rastom korijena zobi te rastom biomase saprotrofnih bakterija i gljiva u tlu. Analizom uzoraka tla 20-30 cm ispod površine nije primijećena mobilnost glifosata kroz vertikalni profil tla. Uz to, korišteni bakterijski sojevi nisu akumulirali potencijalne produkte (aminometil fosforna kiselina (AMPA) i sarkozin) biodegradacije glifosata (Ermakova i dr. 2010).

Budući da je glifosat uvelike primjenjivan na rižinim poljima u Nigeriji, provedeno je istraživanje u kojem su bakterijski sojevi izolirani s tih polja te je testirana njihova prilagodba na različite koncentracije glifosata i usporedba utjecaja glifosata kao izvora ugljika ili izvora fosfora. Uzorci tla su uzimani do 15 cm dubine s 4 različita polja u Nigeriji na kojima je prethodno primjenjivan glifosat. Pet od dvanaest izoliranih bakterijskih sojeva je pokazalo kontinuirani rast na pločama s glifosatom kao izvorom fosfora. Nadalje, *Pseudomonas fluorescens* i *Acetobacter* sp. su najuspješnije koristili glifosat te su korišteni za daljnje istraživanje kinetike rasta bakterija, gdje je *P. fluorescens* pokazao značajno veći rast od *Acetobacter* sp. Rezultati su pokazali kako je rast *P. fluorescens* znatniji od rasta *Acetobacter* sp. kada je glifosat korišten kao izvor i ugljika i fosfora. Rast oba izolata je znatniji kada je glifosat korišten kao izvor fosfora, a glukoza kao izvor ugljika. Nadalje, primijećen je utjecaj različitih koncentracija glifosata na rast pojedinog izolata te oba izolata pokazuju najveći rast pri najmanjoj korištenoj koncentraciji (7.2 mg/ml) (Moneke i dr. 2010).

U istraživanju Adelowo i dr. (2014), testirana je sposobnost biodegradacije glifosata pomoću vrsta gljiva izoliranih iz tla. Uzorci tla su uzeti na lokaciji bez prethodne primjene glifosata i na lokaciji s prethodnom primjenom glifosata, do dubine 10 cm. Izolirane su tri vrste gljiva, *Trichoderma viridae*, *Apergillus niger*, *Fusarium oxysporum* te se pokazalo kako su populacije sve tri vrste veće u uzorku tla s lokacije na kojoj je prethodno primjenjivan glifosat. Dakle, gljive su koristile glifosat kao izvor nutrijenata što je moguće kidanjem ugljik-fosfor (C-P) ili ugljik-dušik (C-N) veze. Spektrofotometrijskom analizom uočeno je kako su sva tri izolata tijekom eksperimenta uspješno rasla na mediju s dodanim glifosatom. *T. viridae* je pokazala najveći rast, a *niger* najmanji. Razina fosfora se tijekom vremena smanjila što ukazuje na mogućnost korištenja glifosata kao izvora nutrijenata. Tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti zabilježeni su metaboliti AMPA i sarkozin. Nakon 7. dana inkubacije, pokazalo se kako je sarkozin najveći produkt degradacije, 89% ukupne koncentracije zabilježenih rezidua, što pokazuje da se degradacija glifosata odvijala uglavnom kidanjem C-P veze. Koncentracija AMPA bila je 6%, a glifosata 5%. Nakon 20. dana inkubacije, glifosat, AMPA i

sarkozin nisu zabilježeni u kulturi što ukazuje na moguću daljnju degradaciju metabolita u druge produkte (Adelowo i dr. 2014).

4.2. BIOREMEDIJACIJA INSEKTICIDA

4.2.1. NEONIKOTINOIDI

Neonikotinoidi su danas najčešće korišteni insekticidi u svijetu te čine jednu četvrtinu svih insekticida u upotrebi. Njihova primjena raste od 1990-ih godina kada je imidakloprid postao komercijalno dostupan. Uzrok tome su brojne prednosti neonikotinoida kao niska toksičnost za kralježnjake, visoka toksičnost za kukce, fleksibilna upotreba. Globalno se 60% neonikotinoida primjenjuje u sjemenarstvu, točnije u pripremi sjemena za sijanje. Topljivi su u vodi, a biljke ih apsorbiraju korijenjem ili listovima nakon čega odlaze u sva tkiva što omogućuje cjelokupnu zaštitu biljke. Mehanizam djelovanja neonikotinoida uključuje snažno vezanje za nikotinske acetilkolinske receptore (nAChR) u središnjem živčanom sustavu kukaca što uzrokuje živčanu stimulaciju pri niskim koncentracijama, a pri visokim koncentracijama blokiranje receptora, paralizu i smrt. Neonikotinoidi se znatno akumuliraju u tlu gdje se dugotrajno zadržavaju, a zabilježeni su u podzemnim vodama i tekućicama. Budući da je primjena neonikotinoida u porastu, pretpostavka je da će s vremenom sve više kukaca razviti otpornost na njih. Male koncentracije neonikotinoida su nađene u peludi i nektaru (Goulson 2013). Smatra se kako 75% svjetskog meda sadrži određene koncentracije insekticida štetnih za pčele, naročito neonikotinoida. S druge strane, utvrđeno je globalno smanjenje populacija pčela, ali i kukaca općenito, te se glavnim uzrokom toga smatra primjena insekticida (Zhang 2018). Uz to, postoje dokazi za značajne subletalne učinke neonikotinoida na pčele poput smanjenog učenja, traganja za hranom, rjeđeg vraćanja u košnice, nemogućnosti pronalaska svoje kolonije s velike udaljenosti (Goulson 2013).

IMIDAKLOPRID

Imidakloprid se najviše primjenjuje na poljima riže, žitarica i povrća. Vrijeme poluraspada varira od 49 do 129 dana (Gangola i dr. 2015). Tijekom istraživanja bioremedijacije imidakloprida uočeno je stvaranje niza metabolita, a jedan od njih je olefin koji je 10 puta toksičniji za kukce i sisavce od samog imidakloprida (Hussain i dr. 2016). Primjena imidakloprida u konstantnom je porastu zbog niske toksičnosti za sisavce, a visoke učinkovitosti u kontroli štetnika (Mohammed i Badawy 2017).

Gangola i dr. (2015) su istraživali mikoremedijaciju imidakloprida temeljenu na uzorcima tla u Indiji iz kojih su izolirane gljive. U istraživanju biodegradacije korišteno je više izoliranih sojeva, a najučinkovitije su se pokazale vrste *Trichoderma longibrachiatum* te *Aspergillus oryzae* s biodegradacijom preko 90% u 15 dana inkubacije. U uzorcima tla s dodanim otpadnim materijalom, biodegradacija je bila i do 99% što ukazuje na mogućnost buduće primjene različitog organskog otpada za povećanje uspješnosti biodegradacije imidakloprida (Gangola i dr. 2015).

Istraživanje mikoremedijacije je također rađeno pomoću soja gljive izoliranog iz odvoda otpadnih voda s poljoprivredne površine u Egiptu gdje su prethodno primjenjivani pesticidi. Morfološkim analizama i sekvenciranjem je soj identificiran kao *Aspergillus terreus*. Rezultati su pokazali kako tolerancija *A. terreus* ovisi o koncentraciji imidakloprida i o prisutnosti saharoze u mediju. Povećana biodegradacija uočena je pri niskoj pH vrijednosti te osnovnim razinama koncentracije imidakloprida i osnovnoj veličini inokuluma. Nakon 12 dana inkubacije, koncentracija imidakloprida pala je za 93.9% početne koncentracije (25 mg L⁻¹). Metabolit 6CNA (6-kloronikotinska kiselina) se na početku biodegradacije imidakloprida pojavljivao u mediju, no nakon 10 dana inkubacije je nestao što ukazuje na degradaciju tog metabolita pomoću *A. terreus* (Mohammed i Badawy 2017).

Istraživanjima bioremedijacije pomoću bakterija, pokazalo se kako mnogi bakterijski sojevi imaju sposobnost više ili manje uspješno degradirati imidakloprid. Neke od tih bakterija su *Pseudomonas* sp., *Leifsonia* sp., *Bacillus* sp., *Stenotrophomonas maltophilia*. Produkti biodegradacije imidakloprida su u većini slučajeva različiti metaboliti, a najčešće 6CNA (Hussain i dr. 2016).

ACETAMIPRID

Acetamiprid je vrlo dobro topljiv u vodi te je umjereno toksičan za vodene organizme. Umjereno je toksičan za sisavce, a visoko toksičan za ptice i gujovice

(<https://sitem.herts.ac.uk>). Uz to, u novim istraživanjima spominju se i štetni utjecaji acetamiprida za ljude (Kanjilal i dr. 2015). Acetamiprid je umjereno do visoko postojan u tlu, s vremenom poluraspada između 353 i 450 dana, ovisno o istraživanju (Hussain i dr. 2016).

U istraživanju Kanjilal i dr. (2015), testirana je biodegradacija acetamiprida iz otpadnih voda s poljoprivrednih površina u Indiji gdje je prethodno primjenjivan. Korišten je soj autohtone bakterije *Micrococcus luteus*. Uz to, istražena je toksičnost metabolita prema bakteriji *Pseudomonas aeruginosa* te utjecaj pH vrijednosti, temperature, brzine centrifuge, vremena inkubacije i početne koncentracije acetamiprida. Ostaci acetamiprida su utvrđeni u uzorcima vode i tla s okolnih područja, stoga je zaključeno kako su se brojne bakterije prilagodile na takav onečišćeni okoliš. Acetamiprid je korišten kao izvor ugljika, dušika i energije. Rezultati su pokazali da je optimalna pH vrijednost za biodegradaciju 6, a optimalno vrijeme inkubacije između 26 i 28 h kada je iskorišteno 72% acetamiprida. Uočeno je povećanje biodegradacije na temperaturama većim od 10 °C, dok je rast bakterije bio najveći pri najmanjoj brzini centrifuge (0-80 rpm) i koncentraciji 30 mg L⁻¹. *M. luteus* je uspješno degradirao 69.84%, a najveća degradacija se odvijala nakon 24 h pri temperaturi 40 °C i početnoj koncentraciji acetamiprida 70 mg L⁻¹. Prema rezultatima istraživanja, metaboliti acetamiprida nisu toksični za *P. aeruginosa*, čak ni pri njihovoj visokoj koncentraciji (50 mg L⁻¹) (Kanjilal i dr. 2015).

Wang i dr. (2011) u istraživanju su proučavali mogućnost biodegradacije i biotransformacije acetamiprida pomoću gljive uzročnika bijele truleži. Gljive uzročnici bijele truleži uspješno razgrađuju lignin do CO₂, a prethodno je utvrđena biodegradacija brojnih onečišćujućih tvari pomoću ligninolitskih enzima. Za istraživanje je korišten soj gljive *Phanerochaete sordida*, izoliran s trulog drveta. Nakon inkubacije, diskovi micelija gljive prenešeni su u tekući medij kojem je dodan acetamiprid. Za istraživanje same biodegradacije korištene su dvije vrste medija, medij s limitiranim dušikom i krumpir-dekstroza medij. Prema rezultatima, u mediju s limitiranim dušikom uklonjeno je 45% acetamiprida nakon 20 dana inkubacije, dok je u krumpir-dekstroza mediju uklonjeno 28% nakon 20 dana inkubacije. Također, testirana je i degradacija acetamiprida pomoću pročišćenih ligninolitskih enzima iz *P. sordida* na mediju s limitiranim dušikom te je analizom rezultata utvrđeno kako ti enzimi nisu degradirali acetamiprid budući da je acetamiprid uklonjen i u mediju bez ligninolitskih enzima (krumpir-dekstroza medij). Uz to, uočeno je pojavljivanje metabolita s molekulskom formulom C₉H₉ClN₄ koji je moguća demetilirana forma acetamiprida (Wang i dr. 2011).

Prethodnim istraživanjima utvrđene su varijabilne sposobnosti degradacije acetamiprida pomoću više vrsta bakterija. *Pigmentiphaga* sp. i *Stentrophomonas* sp. su najbrže transformirale acetamiprid uz stvaranje određenih metabolita. Uz njih, značajna su istraživanja

biodegradacije acetamiprida pomoću sojeva bakterija *Rhodococcus* sp. i *Pseudoxanthomonas* sp. (Hussain i dr. 2016).

5. ZAKLJUČCI

Unatoč tome što je otkriće sintetičkih pesticida bio revolucionaran događaj za poljoprivredu, brojnim znanstvenim istraživanjima potvrđena je njihova štetnost za okoliš, ljude i životinje. Uz njihovo dugotrajno zadržavanje u okolišu i onečišćenje različitih ekosustava, uočava se sve veća potreba za proizvodnjom i primjenom manje štetnih alternativa koja je, prema nekim podacima, u porastu.

Budući da su ostaci pesticida zabilježeni u vodama i tlima, nužno ih je učinkovito ukloniti. Bioremedijacija se navodi kao ekološki prihvatljiva i jeftina tehnologija, a istraživanja bioremedijacije, s obzirom na literaturu, su sve brojnija. Uspješna bioremedijacija moguće je rješenje za eliminaciju pesticida, ali i drugih onečišćujućih tvari. Potrebno je naglasiti kako sam proces bioremedijacije nije u potpunosti istražen te su u utvrđene poteškoće provedbe uspješne bioremedijacije u prirodi. Najvećim problemom smatra se dizajniranje samog postupka budući da se okolišni uvjeti uvelike razlikuju od laboratorijskih te njihova kontrola nije moguća, a poremećaj bilo kojeg čimbenika ograničava rast i učinkovitost organizma koji se koristi u bioremedijaciji.

Iako je bioremedijacija široko prihvaćena tehnologija s nizom prednosti, njena masovna provedba na onečišćenim područjima tek se očekuje. Zbog toga je potrebno i dalje istraživati postupak bioremedijacije za uklanjanje već stvorenih onečišćenja, ali je nužno i shvaćanje negativnih učinaka sintetičkih pesticida i težnja za većom upotrebom ekološki prihvatljivijih alternativa kako bi se spriječila buduća onečišćenja.

6. LITERATURA

- Adelowo, F. E., Olu-Arotiowa, O. A., Amuda, O. S. 2014: Biodegradation of Glyphosate by Fungi Species. *Advances in Bioscience and Bioengineering* **2**, 104-118
- Antizar-Ladislao, B. 2010: Bioremediation: Working with Bacteria. *Elements* **6**, 389-394
- Carvalho, F. P. 2017: Pesticides, environment, and food safety. *Food and Energy Security* **6**, 48-60
- Dahab, A. A., Jallow, M. FA, Albaho, M. S. 2017: Environmental and Human Health Impacts of Pesticide Use in Agriculture. U: *Pesticides, Avid Science*, 2-15
- Đokić, M., Bilandžić, N., Briški, F. 2012: Postupci uklanjanja pesticida iz okoliša. *Kemija u Industriji* **61**, 341-348
- Elekwachi, C. O., Andresen, J., Hodgman, T. C. 2014: Global Use of Bioremediation Technologies for Decontamination of Ecosystems. *Journal of Bioremediation & Biodegradation* **5**, 1-9
- Ermakova, I. T., Kiseleva, N. I., Shushkova, T., Zharikov, M., Zharikov, G. A., Leontievsky, A. A. 2010: Bioremediation of glyphosate-contaminated soils. *Applied Microbiology and Biotechnology* **88**, 585-594
- Frazar, C. 2000: *The Bioremediation and Phytoremediation of Pesticide-contaminated Sites*, U.S. Environmental Protection Agency, Washington
- Gangola, S., Pankaj, Khati, P., Sharma, A., 2015: Mycoremediation of imidaclopid in the presence of different soil amendment using *Trichoderma longibrachiatum* and *Aspergillus oryzae* isolated from pesticide contaminated Agricultural fields of Uttarakhand. *Journal of Bioremediation and Biodegradation* **6**, 1–5.
- Goulson, D. 2013: An overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides. *Journal of Applied Ecology* **50**, 977-987
- Hussain, S., Hartley, C. J., Shettigar, M., Pandey, G. 2016: Bacterial biodegradation of neonicotinoid pesticides in soil and water systems. *FEMS Microbiology Letters* **363**, 1-13
- Iwamoto, T., Nasu, M. 2001: Current Bioremediation Practice and Perspective. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **92**, 1-8

- Kanjilal, T., Bhattacharjee, C., Datta, S. 2015: Bio-degradation of acetamiprid from wetland wastewater using indigenous *Micrococcus luteus* strain SC 1204: Optimization, evaluation of kinetic parameter and toxicity. *Journal of Water Process Engineering* **6**, 21-31
- Kim, K.-H., Kabir, E., Jahan, S. A. 2016: Exposure to pesticides and the associated human health effects. *Science of the Total Environment* **575**, 525-535
- Mohammed, Y. M. M., Badawy, M. E. I. 2017: Biodegradation of imidacloprid in liquid media by an isolated wastewater fungus *Aspergillus terreus* YESM3. *Journal of Environmental Science and Health, Part B* **52**, 752-761
- Moncada, A. 2004: Environmental Fate of Diuron, Environmental Monitoring Branch, Department of Pesticide Regulation, Sacramento, Kalifornija, SAD
- Moneke, A. N., Okpala, G. N., Anyanwu, C. U. 2010: Biodegradation of glyphosate herbicide *in vitro* using bacterial isolates from four rice fields. *African Journal of Biotechnology* **9**, 4067-4074
- Ngigi, A., Getenga, Z., Boga, H., Ndalut, P. 2011: Biodegradation of phenylurea herbicide diuron by microorganisms from longterm-treated sugarcane-cultivated soils in Kenya. *Toxicological & Environmental Chemistry* **93**, 1623-1635
- Safi, J., Awad, Y., El-Nahhal, N. 2014: Bioremediation of Diuron in Soil Environment: Influence of Cyanobacterial Mat. *American Journal of Plant Sciences* **5**, 1081-1089
- Sharma, S. 2012: Bioremediation: Features, Strategies and applications. *Asian Journal of Pharmacy and Life Science* **2**, 202-213
- Velázquez-Fernández, J. B., Martínez-Rizo, A. B., Ramírez-Sandoval, M., Domínguez-Ojeda, D. 2012: Biodegradation and Bioremediation of Organic Pesticides, U: Soundarajan, R. P. (ur.): Pesticides – recent trends in pesticide residue assay, InTech, Hrvatska, 253-272
- Wang, J., Hirai, H., Kawagishi, H. 2011: Biotransformation of acetamiprid by the white-rot fungus *Phanerochaete sordida* YK-624. *Applied Microbiology and Biotechnology* **93**, 831-835
- Wang, Y., Li, H., Feng, G., Du, L., Zeng, D. 2017: Biodegradation of diuron by an endophytic fungus *Neurospora intermedia* DP8-1 isolated from sugarcane and its potential for remediating diuron-contaminated soils. *PLOS ONE* **12**, 1-18

Zacharia, J. T. 2011: Identity, Physical and Chemical Properties of Pesticides. U: Stoytcheva, M. (ur.): Pesticides in the Modern World - Trends in Pesticides Analysis, InTech, Hrvatska, 1-19

Zhang, W. 2018: Global pesticide use: Profile, trend, cost / benefit and more. Proceedings of the International Academy of Ecology and Environmental Sciences **8**, 1-27

Želježić, D., Perković, P. 2011: Uporaba pesticida i postojeće pravne odredbe za njezinu regulaciju. Sigurnost **53**, 141-150

https://agrochemicals.iupac.org/index.php?option=com_sobi2&sobi2Task=sobi2Details&catid=3&sobi2Id=31

<http://www.ccohs.ca/oshanswers/chemicals/pesticides/general.html>

<http://edis.ifas.ufl.edu/pi219>

https://en.wikipedia.org/wiki/Deepwater_Horizon_oil_spill

[https://en.wikipedia.org/wiki/Immobilization_\(soil_science\)](https://en.wikipedia.org/wiki/Immobilization_(soil_science))

<https://www.epa.gov/ingredients-used-pesticide-products/basic-information-about-pesticide-ingredients>

<http://www.fao.org/faostat/en/#data/RP>

<http://www.health.gov.au/internet/publications/publishing.nsf/Content/ohp-enhealth-manual-atsi-cnt-l~ohp-enhealth-manual-atsi-cnt-l-ch5~ohp-enhealth-manual-atsi-cnt-l-ch5.7>

<http://www.mzoip.hr/doc/sk.pdf>

<http://pest.ca.uky.edu/PSEP/pdfs/12pesticides.pdf>

<https://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/Reports/11.htm>

<http://www.unc.edu/ims/paerllab/sansalmo/consortia.htm>

7. SAŽETAK

Primjena pesticida poznata je nekoliko tisuća godina, a proizvodnja sintetičkih pesticida započinje polovicom 20. stoljeća. Nakon upotrebe, većina sintetičkih pesticida se dugotrajno zadržava u okolišu te se njihovi ostaci mogu naći u tlima, morskim i vodenim ekosustavima, pitkoj vodi i podzemnim vodonosnicima. Uz to, zabilježen je povećani mortalitet i ugroženost mnogih skupina organizama. Kroz hranidbeni lanac, ostaci pesticida dopijevaju i do ljudi te uzrokuju različite poremećaje i bolesti.

Bioremedijacija je ekonomski isplativa i održiva tehnologija koja na ekološki prihvatljiv način transformira ili uklanja onečišćujuće tvari iz okoliša pomoću bakterija, biljaka, algi ili gljiva. U ovom radu prikazana su istraživanja bioremedijacije s varijabilnim rezultatima uključujući bioremedijaciju herbicida, diurona i glifosata te insekticida, imidakloprida i acetamiprida, koristeći različite sojeve bakterija i gljiva. Na kraju su istaknuti problemi koji onemogućavaju masovnu primjenu bioremedijacije u prirodi te je njihovo rješenje moguće samo daljnjim istraživanjima.

8. SUMMARY

The application of pesticides has been known for several thousand years, and the production of synthetic pesticides began in the mid-20th century. Most synthetic pesticides stay in the environment for a long time after their use and their residues can be found in soils, marine and aquatic ecosystems, drinking water and underground aquifers. Furthermore, increased mortality and endangerment of many groups of organisms is reported. The pesticide residues reach humans through the food chain and cause various disorders and diseases.

Bioremediation is a cost-effective and sustainable technology that transforms or eliminates pollutants from the environment by bacteria, plants, algae or fungi in an environmentally friendly way. Bioremediation studies with variable results were presented in this paper, including bioremediation of herbicides, diuron and glyphosate, and insecticides, imidacloprid and acetamiprid, using various bacteria and fungi strains. Finally, problems that prevent the massive application of bioremediation were highlighted and their solution is only possible with further research.